

005533134

Ходов

На правах рукописи

Ходов Илья Анатольевич

**ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА И КОНФОРМАЦИОННОЕ
СОСТОЯНИЕ МАЛЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
МОЛЕКУЛ В РАСТВОРАХ ПО ДАННЫМ ОДНО- И
ДВУМЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР**

02.00.04 – Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

18 СЕН 2013

ИВАНОВО – 2013

Работа выполнена в лаборатории «ЯМР-спектроскопия и численные методы исследования жидких систем» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химии растворов им. Г.А. Крестова» Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Альпер Геннадий Аркадьевич

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
доцент
Титов Валерий Александрович (ФГБОУ ВПО
«Ивановский государственный химико-
технологический университет», профессор
кафедры технологии приборов и материалов
электронной техники)

доктор химических наук,
доцент
Ноговицын Евгений Анатольевич
(ФГБОУ ВПО «Ивановский государственный
университет», профессор кафедры общей
и теоретической физики)

Ведущая организация: ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет» (г. Казань)


Защита состоится «7» октября 2013 г. в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 212.063.06 при Ивановском государственном химико-технологическом университете по адресу: 153000, г. Иваново, пр. Ф. Энгельса, 7, ауд. Г-205.

Тел.: (4932) 32-54-33, факс: (4932) 32-54-33, e-mail: dissovets@isuct.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Информационном центре Ивановского государственного химико-технологического университета по адресу: 153000 г. Иваново, пр. Ф. Энгельса, 10.

Автореферат разослан «6» сентября 2013г.

Ученый секретарь
совета Д 212.063.06
e-mail: Egorova-D6@yandex.ru

 Егорова Елена Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Определение пространственной структуры и конформационного состояния молекул в растворах является одной из важнейших задач физической химии. Накопление и обобщение данных о конформационном состоянии молекул в растворе дает возможность подойти к фундаментальному пониманию процессов, протекающих на молекулярном уровне. Эти процессы определяют не только биологическую активность молекул, но также могут определять нуклеацию кристаллов данных соединений из их насыщенных растворов. Малые биологически активные молекулы входят в состав большого числа лекарственных средств, активно используемых в медицине. Так, парацетамол (ацетаминофен, N-(4-гидроксифенил)ацетамид, $C_8H_9O_2N$) обладает анальгетическими и антипиретическими свойствами; фелодипин (3-этил-5-метил-4-(2,3-дихлорфенил)-2,6-диметил-1,4-дигидропиридин-3,5-дикарбоксил, $C_{18}H_{19}Cl_2NO_4$) получил широкое распространение благодаря своим антигипертензивным и антиангинальным свойствам. Ибупрофен ((RS)-2-(4-изобутилфенил)-пропионовая кислота, $C_{13}H_{18}O_2$) – нестероидный препарат, который обладает противовоспалительной активностью и применяется при ревматоидном артрите, деформирующем остеоартрозе и др. заболеваниях для облегчения боли и уменьшения лихорадки.

Среди многообразия физико-химических методов, которые используются при решении указанных фундаментальных проблем, ключевыми являются одно- и двумерная спектроскопия ЯМР ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). Методы спектроскопии ЯЭО в лабораторной (NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) и вращающейся системах координат (T-ROESY – Transverse Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy) дают возможность определять расстояния между ядрами, вплоть до 5 Å. Совместное использование экспериментальных данных ЯМР по межъядерным расстояниям и результатов квантово-химических расчетов позволяет определять относительные населенности конформаций. Однако спектроскопия ЯЭО недостаточно адаптирована к исследованию пространственной структуры малых конформационно подвижных молекул, подпадающих под условие крайнего сужения линий ($\omega_0\tau_c \ll 1$, где τ_c – время корреляции молекулярного движения, ω_0 – угловая скорость прецессии магнитных ядер). Основными факторами, затрудняющими такого рода измерения, являются слабая интенсивность кросс-пиков, длительное время эксперимента, дрейф экспериментальных параметров и др. Кроме того, процессы, обусловленные косвенными путями переноса намагниченности (спиновой диффузией), негативно влияют на спектральные характеристики изучаемых соединений, не позволяя корректно описать их конформационное состояние.

Таким образом, весьма важной задачей является разработка эффективного подхода получения информации о межъядерных расстояниях в малых молекулах с минимальной ошибкой измерения.

Целью диссертационной работы являлось определение пространственной структуры и конформационного состояния биологически активных веществ методами одномерной спектроскопии ЯМР 1H , ^{13}C и одно- и двумерной спектроскопии ЯЭО; разработка и реализация подхода ЯМР NOESY для количественного определения доли конформеров малых нежестких биологически активных молекул в растворах, а также решение задачи подавления эффекта спиновой диффузии при определении межпротонных расстояний методом двумерной спектроскопии ЯМР NOESY.

Методы исследования. При решении поставленных задач использовались современные методы спектроскопии ЯМР высокого разрешения; в частности, в качестве основных были использованы эксперименты по спектроскопии ЯЭО: 2D NOESY, 2D T-ROESY, 1D NOE, 1D T-

ROE и модификация QUIET-NOESY (Quenching Undesirable Indirect External Trouble in Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy). В качестве дополнительных методов использовались 2D TOCSY (TOrtal Correlation SpectroscopY), DOSY (DiFussion-Ordered SpectroscopY), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation), COSY (COReLation SpectroscopY), 1D TOCSY.

Эксперименты проводились с использованием ЯМР спектрометра «AVANCE III 500» фирмы «Bruker» (рабочая частота 500 МГц на ядрах ^1H и 125 МГц на ядрах ^{13}C).

Научная новизна диссертационной работы состоит в следующем:

Впервые определены эффективные (усредненные по всем конформерам) межпротонные расстояния в молекуле парацетамола в его насыщенном растворе в ДМФА с помощью методов двумерной ЯМР спектроскопии ЯЭО. Проведены расчеты доли конформеров путем совместного анализа экспериментальных данных и результатов квантово-химических расчетов.

Впервые получены экспериментальные данные об относительных межпротонных расстояниях в молекулах фелодипина методом одно- и двумерной ЯМР спектроскопии ЯЭО в его растворах в ДМСО при двух концентрациях.

Создана импульсная программа QUIET-NOESY, с использованием которой достигнуто подавление артефактных эффектов переноса намагниченности косвенными путями (спиновой диффузии) в спектрах NOESY фелодипина в ДМСО. Результаты эксперимента QUIET-NOESY подтверждены путем сопоставления с данными NOESY/T-ROESY эксперимента.

Определены доли конформеров молекулы фелодипина в ДМСО при малой концентрации ($0,077 \text{ г/дм}^3$) и в насыщенном растворе.

Получены эффективные межпротонные расстояния в молекуле ибупрофена в его насыщенном растворе в хлороформе методами двумерной ЯМР спектроскопии ЯЭО. Рассчитаны доли конформеров молекулы ибупрофена.

Обнаружена инверсия распределения конформеров изученных малых нежестких молекул (ибупрофена, парацетамола, фелодипина) при переходе от разбавленных растворов к насыщенным.

Основные положения, выносимые на защиту:

Метод определения населенности конформационных состояний для малых нежестких молекул в растворах в случае нескольких конформационных равновесий (по данным 1D и 2D спектроскопии ЯМР)

Программы для импульсной последовательности QUIET-NOESY, реализующие подавление спиновой диффузии в 2D экспериментах NOESY.

Результаты экспериментов по определению эффективных межпротонных расстояний в молекулах парацетамола, фелодипина и ибупрофена в растворах.

Выявленный эффект инверсии распределения конформеров малых нежестких молекул (парацетамола, ибупрофена, фелодипина) при переходе от разбавленных к насыщенным растворам.

Обоснованность и достоверность результатов подтверждается согласием полученных данных с результатами исследований, проводимых другими методами, в частности, с данными численного моделирования и ИК спектроскопии; сравнением различных подходов в ЯМР спектроскопии (например, с данными анализа сопоставления констант скорости кросс-релаксации NOESY/T-ROESY и одномерной селективной спектроскопии NOE, в тех случаях, когда это было возможно); использованием современного оборудования и методических подходов к исследованию.

Практическая значимость работы:

Предложенная методика позволяет эффективно исследовать структуру малых конформационно подвижных молекул лекарственных соединений в условиях предельного сужения ($\omega_0 \tau_c \ll 1$).

Результаты имеют важное значение для понимания биологической активности малых нежестких молекул лекарственных соединений (ибупрофена, парацетамола, фелодипина) в растворах. Описание конформационного состояния изученных молекул в растворах может использоваться при анализе межмолекулярных взаимодействий, которое во многом определяет их биологическую активность. Установленная закономерность инверсии населенности конформационного состояния исследованных молекул может помочь выявить пути получения кристаллов данных соединений тех или иных полиморфных форм из насыщенных растворов.

Личный вклад автора. Участие при постановке целей и задач исследования. Выполнение экспериментов ЯМР по изучению пространственной структуры малых конформационно подвижных молекул. Обработка, анализ и интерпретация теоретических и экспериментальных данных. Формулировка основных положений и выводов диссертации.

Апробация работы. Результаты работы были доложены и обсуждены на международной конференции «Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter. NMR in Heterogeneous Systems» (St. Petersburg, Russia, 2010); V Всероссийской конференции «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях» (Казань, 2011); XXV Международной Чугаевской конференции по координационной химии (Суздаль, 2011); XI Международной конференции «Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах» (Иваново, 2011); VI и VII конференциях молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем» (Иваново, 2011–2012); XVI Симпозиуме по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул (Иваново, 2011); XV международной молодежной научной школе «Actual Problems of Magnetic Resonance and its Applications» (Kazan, Russia, 2012); международной конференции «Kinetics and mechanisms of crystallization and next generation material» (Ivanovo, Russia, 2012); XIX Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем» (Йошкар-Ола, 2012).

Диссертационная работа выполнена в ИХР РАН в соответствии с основными научными направлениями фундаментальных исследований РАН по теме «Молекулярные и ион-молекулярные жидкофазные системы в широком диапазоне параметров состояния, включая сверхкритическое. Структура, динамика и сольватационные эффекты» (№ гос. регистрации 01200950825) (2010–2011 г.) и по теме «Развитие подходов и методов физической химии в исследовании многокомпонентных супрамолекулярных, молекулярных и ион-молекулярных систем как перспективных материалов» (№ гос. регистрации 01201260481) (2012–2013 г.). Работа была поддержана федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (Г.К. №02.740.11.0857), международной программой имени Марии Кюри (FP7-PEOPLE-2009-IRSES), грант № 247500, а также грантами Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) (№ 12-03-31001 мол_а и № 12-03-00775_а).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 работ, из них 3 статьи в рецензируемых журналах и 13 работ в сборниках трудов и тезисов вышеперечисленных Международных и Российских научных конференций.

Структура и объем работы. Работа состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы, авторского списка литературы и приложений. Работа изложена на 170 страницах, содержит 69 рисунков и 31 таблицу. Список цитированной литературы содержит 320 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель, приведены методы и объекты исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, представлены выносимые на защиту научные положения.

В первой главе на основе литературных данных изложены положения теории одномерной спектроскопии ЯМР, теории релаксации, ядерного эффекта Оверхаузера. Описаны одномерные селективные методы с импульсным градиентом магнитного поля (gradient selective pulses), такие, как *gsTOCSY*, *gsNOESY*, *gsT-ROESY*.

Во второй главе изложены основные особенности двумерной спектроскопии ЯМР, а также более подробно рассмотрено применение импульсной последовательности NOESY для определения пространственной структуры различных конформаций и расчета отдельных межпротонных расстояний в органических молекулах.

В третьей главе рассмотрены объекты и методы исследования. Дано теоретическое описание основных типов конформаций и конформационных переходов, а также известных полиморфных модификаций и их связь с конформерами для рассмотренных соединений. Изложены технические особенности проведения эксперимента и обработки результатов.

Четвертая глава посвящена анализу подходов к определению пространственной структуры и конформационного состояния малых жестких молекул в растворах на основе согласованного использования полученных экспериментальных данных спектроскопии ЯМР и результатов квантово-химического моделирования.

Изложены возможные подходы к определению межпротонных расстояний в растворах для конформационно жестких молекул на основе одно- и двумерной спектроскопии ЯМР ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) в лабораторной (NOESY) и вращающейся системах координат (T-ROESY), а также описаны модели усреднения расстояний, полученных на основе данных квантово-химических расчетов. Изложены подходы к определению доли конформеров в растворах путем совместного анализа экспериментальных данных и результатов квантово-химических расчетов.

Ключевым моментом одно- и двумерных экспериментальных подходов ЯМР является анализ зависимости значений интегральных интенсивностей сигналов в спектрах ЯЭО от величины времени смешивания. На основе данной зависимости с использованием различных способов интерпретации и обработки экспериментальных данных получают информацию о скорости кросс-релаксации.

Известное в ЯМР спектроскопии приближение начальной скорости кросс-релаксации позволяет значительно упростить анализ такого рода. В рамках данного приближения скорость изменения интенсивности кросс-пиков прямо пропорциональна значениям скорости кросс-релаксации σ_{ij} . При этом сами скорости кросс-релаксации спиновых систем i и j обратно пропорциональны расстоянию r_{ij} в шестой степени между данными спинами: $\sigma_{ij} \sim 1/r_{ij}^6$. При известном расстоянии r_{ref} в одной калибровочной паре ядер с соответствующей скоростью кросс-релаксации σ_{ref} можно из относительных значений констант кросс-релаксации определить рас-

стояния между остальными взаимодействующими ядрами: $r_{ij} = r_{ref} \left(\frac{n_y \sigma_{ref}}{n_{ref} \sigma_{ij}} \right)^{1/6}$ (1), где n_y – насе-

ленность спиновых состояний для данного сигнала в спектре исследуемого образца. Расстояние между протонами зависит от конформационного равновесия в растворе. Поэтому калибровоч-

ные расстояния r_{ref} подбирались для каждого соединения индивидуально, а иногда использовались дополнительные калибровочные расстояния.

При исследовании малых конформационно подвижных молекул, которые характеризуются коротким временем корреляции (τ_c), данный подход не дает адекватных результатов из-за ряда экспериментальных особенностей, затрудняющих получение точных межпротонных расстояний.

Нами разработан подход к определению пространственной структуры и конформационного состояния для малых нежестких молекул, который заключается в следующем:

1. На основе данных одномерной ^1H , ^{13}C и двумерной TOCSY, HSQC, HMBC спектроскопии ЯМР растворов исследуемого соединения производится отнесение сигналов к соответствующим группам резонирующих ядер. В качестве дополнительного источника информации для отнесения линий используется двумерная обменная спектроскопия NOESY, двумерная диффузионная спектроскопия DOSY и одномерная селективная спектроскопия 1D TOCSY.
2. Производится оценка времени корреляции (τ_c) на основе анализа результатов двумерного диффузионного эксперимента DOSY, после чего выбирается экспериментальный подход к определению скоростей кросс-релаксации с подавлением или без подавления косвенных путей переноса намагнитченности.
3. Производится запись ряда двумерных спектров ЯМР NOESY с различным значением времени смешивания τ_m . Диапазон изменения значений τ_m выбирается так, чтобы последние τ_m позволяли получать наибольшие значения интегральной интенсивности кросс-пигов. При соблюдении данного условия величина отношения сигнал/шум получается максимальной. Релаксационная задержка выбирается равной $2 \cdot T_1$, где T_1 – время спин-решеточной релаксации исследуемой группы протонов. Все спектры записываются за один проход для рационального использования времени эксперимента и уменьшения эффектов, связанных с дрейфом параметров.
4. На основе анализа данных теоретического моделирования молекул и предварительных экспериментов 2D NOESY производится оценка отношения количества экспериментально определяемых межпротонных расстояний, меньших 5 \AA , к числу возможных конформеров. В случае большего числа возможных конформеров в сравнении с количеством экспериментально определяемых расстояний следует проводить дополнительные эксперименты T-ROESY и 1D NOE, T-ROE с аналогичными параметрами. Это позволяет получить более детальную информацию о пространственной структуре и конформационном состоянии исследуемого соединения.
5. Путем последующего анализа записанных спектров определяются значения абсолютных интегральных интенсивностей пиков одно- и двумерных спектров исследуемого соединения для всех времен смешивания τ_m .
6. Для двумерных спектров вычисляются усредненные значения (с предварительным отнесением интегральных интенсивностей) кросс-пигов a_{ij} , a_{ji} к диагональным пикам a_{jj} , a_{ii} . В случае вычисления межядерных расстояний между протоном и метильной группой необходимо использовать в расчете отношение населенности спиновой системы $1/3$.
7. Полученные усредненные интегральные интенсивности \bar{I} при малых значениях времени τ_m аппроксимируются линейно. По наклону линейной аппроксимации экспериментальных данных определяются скорости кросс-релаксации.
8. На основе полученных таким образом констант скорости кросс-релаксации вычисляются величины межпротонных расстояний в молекуле с использованием соотношения (1).

9. В случае недостаточного количества межъядерных расстояний или в отсутствие подходящего калибровочного расстояния необходимы данные дополнительного эксперимента

T-ROESY с использованием формулы: $\frac{\sigma_{\text{NOESY}}}{\sigma_{\text{T-ROESY}}} = \frac{10 + 42\omega^2\tau_{\text{eff}}^2 - 32\omega^4\tau_{\text{eff}}^4 - 32\omega^6\tau_{\text{eff}}^6}{10 + 63\omega^2\tau_{\text{eff}}^2 + 96\omega^4\tau_{\text{eff}}^4 + 16\omega^6\tau_{\text{eff}}^6}$ для вычисления локальных времен корреляции τ_{eff} . Применяя соотношения:

$$J^n(\omega) = \frac{2}{5} \left(\frac{S^2 \tau_{\text{eff}}}{1 + (n \omega \tau_{\text{eff}})^2} \right) \text{ и } \sigma_{ij} = \frac{1}{10} \hbar^2 \gamma^4 \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \sum_{i=1, j \neq i}^N \frac{n_i}{r_{ij}^6} (6J_{ij}^2(\omega) - J_{ij}^0(\omega)), \text{ (где } J^n - \text{ функция}$$

спектральной плотности n-го порядка, S – обобщенный параметр порядка), \hbar – постоянная Дирака, γ – гиромагнитное отношение, μ_0 – магнитная постоянная, ω – циклическая частота резонанса) вычисляют абсолютные межпротонные расстояния.

10. Производится вычисление усредненных расстояний по данным квантово-химических расчетов для всех конформеров согласно выражениям: $r_{ij}^{\text{ср}} = \left[\frac{1}{n_i n_s} \sum_j \frac{1}{r_{ij}^6} \right]^{-\frac{1}{6}}$ (2), где n_i, n_s – населенности спиновых состояний – для пары протонов (r^{*}), $r_{ij}^{\text{ср}} = \left[\frac{1}{n_i n_s} \left(\sum_j \frac{1}{r_{ij}^6} \right)^2 \right]^{-\frac{1}{6}}$ (3) – для протон-

метиленовых групп атомов $\langle r^{-3} \rangle^2$, $r_{ij}^{\text{ср}} = \left[\frac{1}{5} \sum_{k=-2}^2 \left| \frac{1}{3} \sum_{N=1}^3 Y_{2k} \left(\frac{\theta'_{mol} \varphi'_{mol}}{r_{ij}^3} \right) \right|^2 \right]^{-\frac{1}{6}}$ (4) где $Y_{2k}(\theta'_{mol} \varphi'_{mol})$ – сферические функции второго порядка, – для протон-метиленовых групп атомов $\langle r_{ij}^{-3} \rangle^2$.

11. Производится оценка населенности конформеров на основе совместного анализа экспериментально полученных значений межпротонных расстояний с усредненными теоретическими расстояниями для каждого отдельного конформера. В случае одного конформационного равновесия доля конформеров i-ой компоненты рассчитывается по формуле

$$\frac{1}{r_{\text{exp}}^6} = \frac{x_1}{r_1^6} + \frac{1-x_1}{r_2^6} \quad (5) \quad x_1 = \frac{r_1^6(r_2^6 - r_{\text{exp}}^6)}{r_{\text{exp}}^6(r_2^6 - r_1^6)} \quad x_2 = 1 - x_1, \text{ а в случае двух и более конформационных}$$

равновесий применяется ридж-регрессионный анализ.

Предложенная методика, основанная на вычислении межпротонных расстояний из отношения скорости кросс-релаксации, позволяет определять не только относительные значения расстояний между взаимодействующими группами протонов, но и оценить населенность конформеров. Основным преимуществом предложенного подхода является существенное увеличение точности в определении межпротонных расстояний, что в значительной степени сказывается на конформационном состоянии.

Пятая глава посвящена описанию и обсуждению основных экспериментальных результатов работы. Предложенная и описанная нами методика определения конформационного состояния и пространственной структуры была апробирована и отработана на ряде соединений. Первой изученной системой стал раствор парацетамола в N,N-диметилформамиде (ДМФА).

Молекула парацетамола (рисунок 1) имеет нежесткую структуру, ее конформационная подвижность связана с внутренним вращением амидного фрагмента и гидроксильной группы, причем вращение метильной группы в амидном

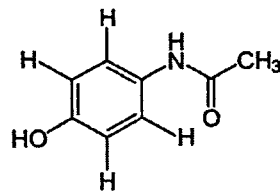


Рисунок 1. Структурная формула парацетамола.

фрагменте рассматривают отдельно. В работе [1] Ли и соавторами было показано, что молекула парацетамола имеет транс- и цис- конформеры (рисунок 2, структуры А и В, соответственно), отличающиеся поворотом гидроксильной группы относительно карбонильной. В литературе также указывается на существование конформермеров, которые различаются поворотом амидной группы относительно бензольного кольца (рисунок 2, структуры С и D, соответственно) [2].

Выбор растворителя был обусловлен высокой растворимостью парацетамола в ДМФА. Экспериментальные и расчетные величины межпротонных расстояний в молекуле парацетамола в ДМФА приведены в таблице 1. Для протонных пар Н4 – NH и NH – Н6 (рисунок 2) в конформациях А и В различия в экспериментальных и расчетных значениях довольно малы (2,60 и 2,52 Å; 2,73 и 2,87 Å, соответственно), тогда как в конформациях С и D расчет дает значительное несоответствие с экспериментом (усредненное расстояние 2,99 Å в сравнении с экспериментальным 2,60 Å, и усредненное 3,98 Å в сравнении с экспериментальным 2,87 Å). Для протонных пар Н6 – Н4 (рисунок 2) согласие с экспериментом значительно хуже для всех конформаций (4,99 и 3,53 Å вместо 4,11 Å в эксперименте). Такое расхождение связано с увеличением погрешности эксперимента при больших межъядерных расстояниях (>4 Å). Учет влияния спин-вой диффузии на экспериментальные значения расстояний, получаемые анализом спектров 2D NOESY, должен приводить к возрастанию этих расстояний, что приближает их величины к расчетным значениям для конформаций А и В (рисунок 2).

Таблица 1. Экспериментальные $r_{\text{экс}}$ (2D NOESY в ДМФА) и эффективные расчетные расстояния (МО6 6-31++g(d,p) с учетом растворителя) конформеров А-D молекул парацетамола.

Пары атомов	$r_{\text{экс}}$ Å	Расчетные расстояния Å											
		Конф. А			Конф. В			Конф. С			Конф. D		
		$\langle r_{\theta,\gamma}^{-3} \rangle^2$	$\langle r^{-3} \rangle^2$	$\langle r^{-6} \rangle$	$\langle r_{\theta,\rho}^{-3} \rangle^2$	$\langle r^{-3} \rangle^2$	$\langle r^{-6} \rangle$	$\langle r_{\theta,\rho}^{-3} \rangle^2$	$\langle r^{-3} \rangle^2$	$\langle r^{-6} \rangle$	$\langle r_{\theta,\rho}^{-3} \rangle^2$	$\langle r^{-3} \rangle^2$	$\langle r^{-6} \rangle$
ОН-Н5	Калибровка	2.56			2.56			2.56			2.56		
NH-Н4	2.60 ±0.05	2.52			2.52			2.99			2.99		
NH-Н6	2.87 ±0.08	2.73	2.68	2.53	2.73	2.68	2.53	3.98	3.81	3.82	3.98	3.81	3.82
Н6-Н5	4.11 ±0.09	4.99	4.86	4.81	4.99	4.86	4.81	3.53	3.39	3.26	3.53	3.39	3.26

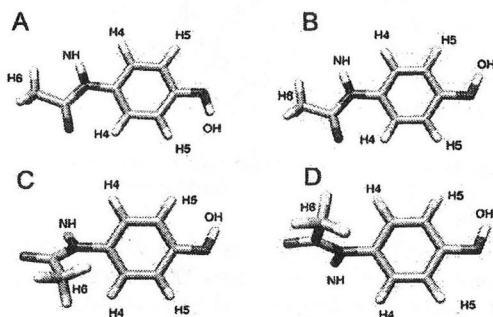


Рисунок 2 Возможные конформеры парацетамола А-D, полученные из квантово-химических расчетов

Учет внутреннего вращения метильной группы CH_3 в молекуле парацетамола был произведен на основе формулы (4). Количественные различия между результатами, полученными с использованием соотношений (2), (3) и (4), оказались весьма существенными. Наиболее корректный способ учета внутреннего вращения метильной группы, основанный на применении формулы (4), дает процентный состав конформеров А и В парацетамола в ДМФА, приведенный на рисунке 3

(в данной работе неразличимыми являются конформации А и В, а также С и D (рисунок 2)).

Также были проведены расчеты совместно с объединенным физико-химическим центром растворов ИХР РАН и ИГХТУ на основе различных базисов без учета растворителя. Менее существенное влияние на результаты расчетов оказывает учет влияния растворителя, проводимый в рамках континуальной модели. Заметное изменение в значениях расстояний наблюдается лишь для пары Н6–Н4.

Наиболее значимым представляется влияние растворителя на энергию образования конформеров. Изменение энергии образования конформеров при учете влияния растворителя достигает 2 кДж/моль. На основе сравнения экспериментальных значений межпротонных расстояний, найденных методом 2D NOESY, с расчетными значениями (квантово-механические методы) определены населенности конформационных состояний парацетамола в ДМФА согласно формуле (5). Однако различие долей конформеров в зависимости от расчетных базисов, приведенных в таблице 2, незначительно. Итоговое распределение конформеров, представленное на рисунке 3, бралось как среднее по расчетным базисам. Проведены также сравнения экспериментальных долей с расчетными данными полученными на основе распределения Больцмана (рисунок 3). Отклонение экспериментальных значений населенности конформеров от теоретических связано не только с влиянием растворителя (расчеты приведены для вакуума), но и, как мы предполагаем, с частичной инверсией конформационного состояния при переходе от разбавленных растворов к насыщенным.

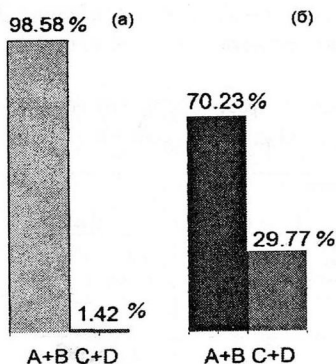


Рисунок 3. Доли конформеров молекул парацетамола в вакууме рассчитанные на основе энергии конформеров в базисах Aug-CC-pVTZ (a) и полученное из эксперимента ЯМР в растворе (б).

фелодипина в ДМСО. Выбор растворителя был обусловлен не только высокой растворимостью фелодипина в этом растворителе, но и практической значимостью применения ДМСО при нуклеации из насыщенного раствора.

Конформационная подвижность молекулы фелодипина определяется двумя двугранными углами: (C3–C4–C1'–C2'), который задает вращение 2,4-дихлорфениловой группы вокруг связи C1'–C4, и (C3a–O–C3b–C3c), связанным с вращением этиленовой группы вокруг связи O–3b (рисунок 4). Теберекидис и Сигала в 2007 году опубликовали результаты теоретического исследования фелодипина с использованием метода гибридного функционала плотности B3LYP [3]. В данной работе выделяют шесть конформеров с очень

Таблица 2. Населенности конформационных состояний А+В (выражены в мольных долях), полученные путем сравнения экспериментальных состояний с теоретическими в различных расчетных базисах

	NH-H4	NH-H6	H6-H5
6-31++g(d,p) in vacuum	0.69	0.71	0.69
MO6 6-31++g(d,p) in vacuum	0.73	0.73	0.66
aug-CC-pVTZ in vacuum	0.65	0.69	0.78
MO6 6-31++g(d,p) in DMF	0.70	0.73	0.68

для пары Н6–Н4.

Следующей системой, изученной нами, является раствор фелодипина в ДМСО. Выбор растворителя был обусловлен не только высокой растворимостью фелодипина в этом растворителе, но и практической значимостью применения ДМСО при нуклеации из насыщенного раствора.

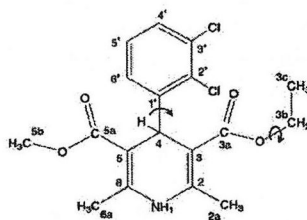


Рисунок 4. Структурная формула фелодипина

близкими энергиями (в пределах 4,2 кДж/моль), начиная с А (глобальный минимум) до F (с максимальной энергией). Отметим, что для конформеров А, В, и Е атомы хлора повернуты в том же направлении, что и протоны NH1, тогда как в конформерах С, D, и F кольца дихлорфенила повернуты на 180° и атомы хлора находятся ближе к протонам H4 (рисунки 4 и 5).

Таблица 3. Экспериментальные $r_{\text{экс}}$ (2D NOESY в ДМСО) и усредненные расчетные расстояния для конформеров фелодипина [3].

Пары атомов	$r_{\text{экс}}$ Å	Расчетные расстояния Å					
		Конф. А	Конф. В	Конф. С	Конф. D	Конф. Е	Конф. F
H3b-H3c	Калибровка	2,69	2,69	2,69	2,69	2,69	2,69
H4-H6'	2,21 ± 0,03	2,12	2,12	3,73	3,73	2,12	3,73

В таблице 3 приведены экспериментальные межъядерные расстояния, определенные методом 2D NOESY и значения расстояний,

полученных из квантово-химических расчетов при малой концентрации (0,077 г/дм³).

Из таблицы видно, что для пары ядер H4-H6' расчетные значения расстояний близки к экспериментальным для конформаций А, В и Е (2,12 и 2,21 Å, соответственно).

В то же время расчетные значения расстояний (3,73 Å) для конформаций С, D и F далеки от экспериментальной величины. Расстояния, полученные на основе анализа 1D NOE для малой концентрации, приведены в таблице 4. Результаты эксперимента 1D NOE говорят в пользу существования в растворе некоторого количества конформеров С, D и F.

Обращает на себя внимание хорошее согласие между экспериментальными и расчетными значениями расстояний для протонов NH-H6' (таблица 4). Соответствующие расстояния для конформаций А, В и Е являются слишком большими, так как превышают

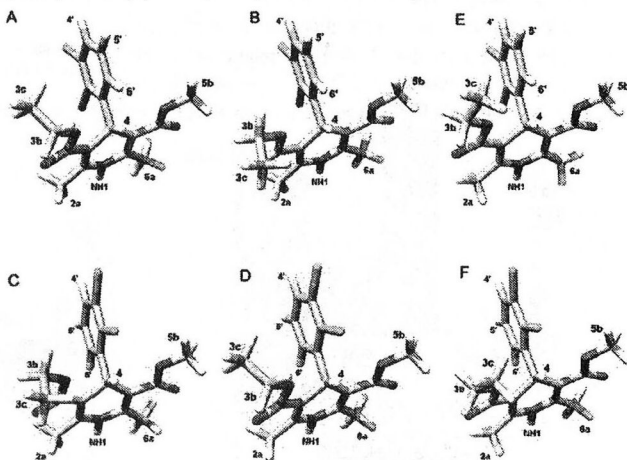


Рисунок 5. Возможные конформеры фелодипина А-F полученные из квантово-химических расчетов [3].

чувствительность эксперимента NOE (>6 Å), и они не приведены в таблице 4. Результаты эксперимента DOSY позволили получить приближенное значение времени корреляции τ_c и,

Таблица 4. Экспериментальные $r_{\text{экс}}$ (1D NOESY в ДМСО с селективным облучением сигналов NH) и усредненные расчетные расстояния конформеров фелодипина [3].

Пары атомов	$r_{\text{экс}}$ Å	Расчетные расстояния Å					
		Конф. А	Конф. В	Конф. С	Конф. D	Конф. Е	Конф. F
NH-H2a	калибровка	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48
NH-H6a	2,50 ± 0,08	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48
NH-H6'	3,44 ± 0,06	-	-	3,50	3,48	-	3,37

Результаты эксперимента DOSY позволили получить приближенное значение времени корреляции τ_c и,

таким образом, провести оценку выполнения условия крайнего сужения ($\omega_0\tau_c \ll 1$). Было установлено, что величина τ_c соответствует некоторому отклонению от данного условия в сторону режима спиновой диффузии ($\omega_0\tau_c \gg 1$).

Для подавления влияния спиновой диффузии была применена импульсная последовательность QUIET-NOESY с использованием созданной нами программы для спектрометра Bruker Avance III. Величина межъядерного расстояния H4-H6', определенная по данным эксперимента QUIET-NOESY, составила для малой концентрации 2,31 Å (в сравнении со значением 2,21 Å в стандартном эксперименте NOESY, таблица 3). Дополнительная проверка корректности результатов эксперимента QUIET-NOESY проводилась с использованием экспериментов NOESY/T-ROESY.

Полученные значения для расстояний H3b-H3c и H4-H6' составили 2,68 Å (в сравнении с расчетным 2,67 Å, таблица 3) и 2,38 Å (расчетное расстояние составило 2,31 Å, таблица 3), соответственно. Одномерный эксперимент с импульсным

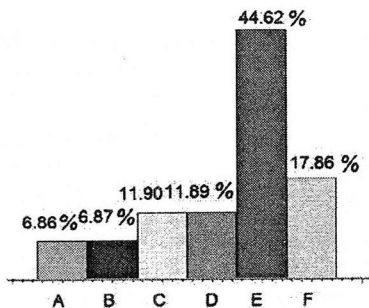


Рисунок 6. Распределение конформеров фелодипина в ДМСО при малой концентрации.

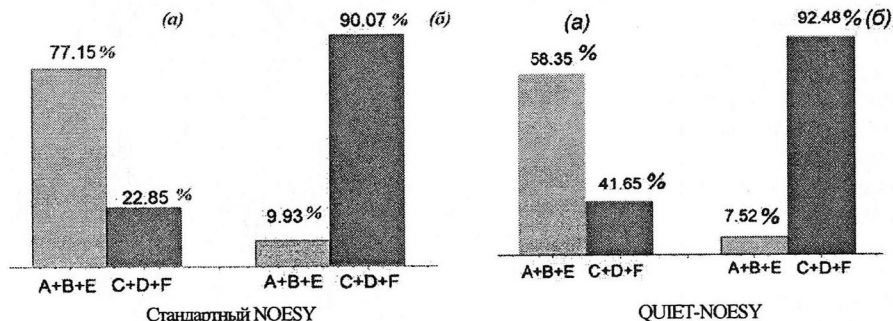


Рисунок 7. Распределения конформеров фелодипина в ДМСО при малой концентрации (а) и в насыщенном растворе (б) по данным спектроскопии ЯЭО.

градиентом магнитного поля проводился также с подавлением спиновой диффузии. Полученные значения для расстояний NH-H2a, NH-H6a и NH-H6' составили 2,47 Å (хорошо коррелирует с расчетным значением 2,48 Å, таблица 4), 2,56 Å (подтверждает расчетное значение 2,50 Å, таблица 4) и 3,46 Å (в сравнении с расчетным значением 3,44 Å, таблица 4). Благодаря наличию данных о расстояниях из дополнительных экспериментов ID NOE и NOESY/T-ROESY при малой концентрации получена детальная информация о конформационном состоянии, которое приведено на рисунке 6. Из рисунка видно, что доли конформеров A и B равны и составляют 6,87%, доли C и D также равны и составляют 11,90%. Преобладающей конформацией для молекул фелодипина является E – 44,62%, а доля конформера F составляет 17,86%. В насыщенном растворе фелодипина в ДМСО наблюдается противоположная ситуация. Так, экспериментальное расстояние 2,98 Å для пары ядер H4-H6' близко к экспериментальному для конформаций C, D и F (2,98 и 3,37 Å, соответственно). Для насыщенного раствора были также проведены эксперименты QUIET-NOESY. Полученные значения для расстояний H4-H6' составили 3,08 вместо 2,98 Å. Необходимость подавления спиновой диффузии демонстрирует рисунок 7: раз-

нища в населенностях конформационных состояний, определенных стандартным методом и методами с подавлением спиновой диффузии, оказывается существенной для малой концентрации (около 20%) и относительно небольшой (2–3%) в насыщенном растворе. Также обращает на себя внимание тот факт, что доли конформеров, которые преобладали при малой концентрации, становятся малы в насыщенном растворе, и наоборот.

Последней изученной системой был ибупрофен в хлороформе. Молекулы ибупрофена имеют хиральный центр на α -углеродах и могут существовать в R (–) и S (+) энантиомерных формах. Коммерческая форма ибупрофена является рацемической смесью энантиомеров. Стоит отметить, что только S(+) форма является фармакологически активной. Однако неактивная форма R(–) может подвергаться в естественных условиях однонаправленной хиральной инверсии на активную S(+). Молекула ибупрофена имеет нежесткую структуру, связанную с внутренним вращением как целого

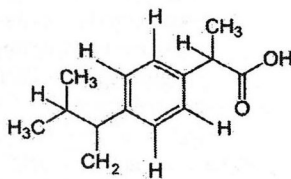


Рисунок 8. Структурная формула ибупрофена.

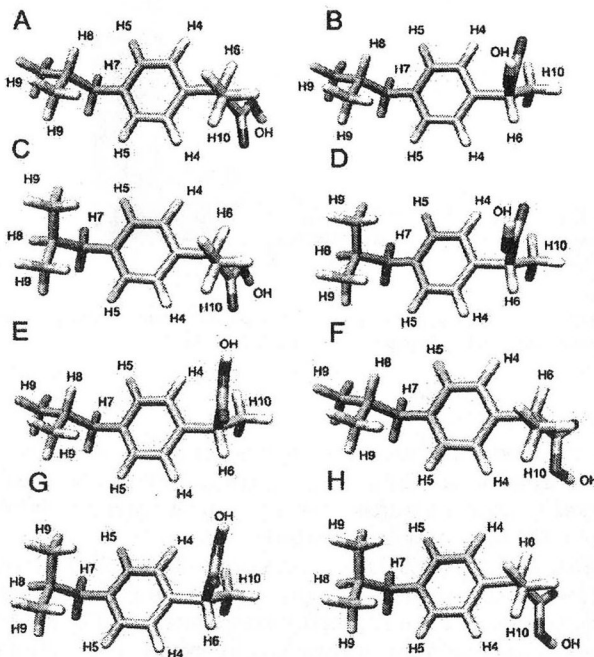


Рисунок 9. Возможные конформеры ибупрофена (A–H), полученные из квантово-химических расчетов [6].

конформеров G, H, доли которых составляют 43,13% и 43,87% (рисунок 10), соответственно; населенность остальных конформеров A–F в сумме составляет 13,34%. Распределение данных конформеров по Больцману в вакууме: 75%(A+B), 14%(C+D), 9%(E+F) и 2%(G+H) при ком-

фрагмента пропионовой кислоты, так и изобутильного остатка. Причем вращение метильных или карбоксильной групп, входящих в эти фрагменты, можно рассматривать независимо друг от друга. В результате образуется несколько конформеров для одной молекулы, которым соответствуют минимумы полной энергии. В работе [6] на основе квантово-химических расчетов было предсказано 8 возможных различных конформаций ибупрофена (рисунок 9). Сравнивая результаты колебательной спектроскопии и квантово-химических расчетов, авторы отмечают возможность ограничения только 4 различными конформерами, на что указывает и незначительная разница в энергиях.

Анализ спектров 2D NOESY ибупрофена в растворе хлороформа по предложенной нами

схеме показал преобладание

натной температуре [4] (рисунок 11). Также были проведены сравнения экспериментальных величин с расчетами (рисунок 11 а). На рисунке 11 также сравниваются экспериментальные величины с расчетами в вакууме. Как и в случае с фелодипином в ДМСО, наблюдается инверсия распределения конформационных состояний при переходе от разбавленного раствора к насыщенному.

Таким образом, нами обнаружена инверсия распределения конформеров малых нежестких молекул при переходе от разбавленных к насыщенным растворам.

При этом для фелодипина и ибупрофена инверсия является существенной (практически полной), а для парацетамола менее значительной (частичной).

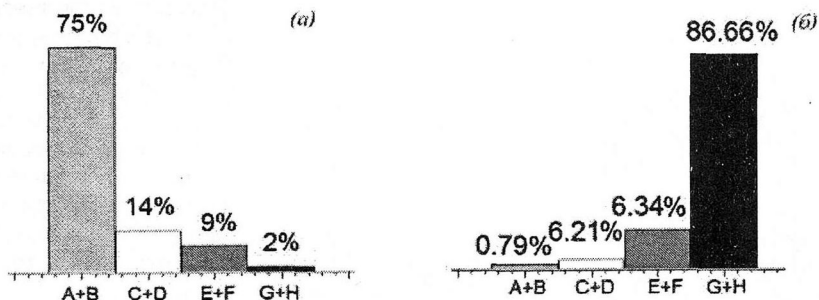
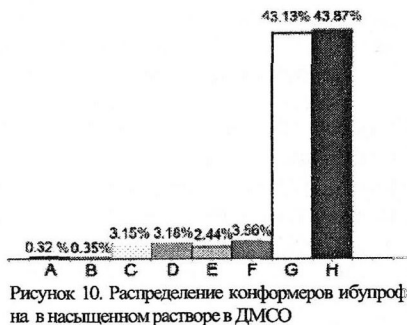


Рисунок 11. Распределения конформеров ибупрофена, рассчитанные из данных квантово-химического моделирования (а) и полученных по данным анализа спектров 2D NOESY в хлороформе в насыщенном растворе (б)

Выводы

1. Разработан подход к определению населенностей конформационных состояний малых нежестких молекул в растворах в случае нескольких конформационных равновесий, основанный на совместном использовании данных квантово-химических расчетов и экспериментально определенных (ЯМР NOESY) межядерных расстояний.
2. Созданы импульсные программы QUIET-NOESY для спектрометров Bruker Avance, которые применены для регистрации одно- и двумерных спектров ЯЭО с подавлением эффекта спиновой диффузии. Показано, что в относительно вязких растворителях (ДМСО, ДМФА) эффект спиновой диффузии оказывает существенное влияние при определении межпротонных расстояний и расчета параметров конформационного равновесия малых нежестких молекул.
3. Методом двумерной спектроскопии NOESY определены межпротонные расстояния для молекулы парацетамола в растворе ДМФА. Показана необходимость учета внутреннего вращения метильной группы, и определены населенности конформеров.
4. На основе согласованного анализа результатов одно- и двумерной спектроскопии ЯМР (1D, 2D NOESY, T-ROESY) найдены доли конформеров фелодипина в растворах ДМСО (в рас

бавленном растворе и в растворе, близком к насыщению). Показано согласие с результатами эксперимента QUIET-NOESY.

5. Определены межпротонные расстояния для молекулы ибупрофена в растворе хлороформа методом двумерной спектроскопии NOESY.
6. Обнаружена инверсия распределения конформеров малых нежестких молекул при переходе от разбавленных к насыщенным растворам. При этом для фелодипина и ибупрофена инверсия является полной, а для парацетамола частичной.

Цитируемая литература

1. Lee S.J. и др. Conformationally resolved structures of jet-cooled acetaminophen by UV-UV hole-burning spectroscopy. // Physical chemistry chemical physics. 2011. Т. 13. № 37. С. 16537–16541.
2. Binev I.G., Vassileva-Bojadjeva P., Binev Y.I. Experimental and ab initio MO studies on the IR spectra and structure of 4-hydroxyacetanilide (paracetamol), its oxyanion and dianion // Journal of Molecular Structure. 1998. Т. 447. № 3. С. 235–246.
3. Teberekidis V.I., Sigalas M.P. Theoretical study of hydrogen bond interactions of felodipine with polyvinylpyrrolidone and polyethyleneglycol // Journal of Molecular Structure: THEOCHEM. 2007. Т. 803. № 1-3. С. 29–38.
4. Vueba M.L., Pina M.E., Carvalho L.A.E.B. De. Conformational Stability of Ibuprofen: Assessed by DFT Calculations and Optical Vibrational Spectroscopy // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008. Т. 97. № 2. С. 845–859.

Публикации автора по теме диссертации:

1. Ходов И.А., Кумеев Р.С., Никифоров М.Ю., Голубев В.А., Альпер Г.А. Гурьянов А.В. Комплексообразование 5,10,15,20-тетра(4 - хлорфенил) порфирина цинка с DABCO по данным ЯМР ^1H в бензоле и хлороформе // Жидк. крист. и их практ. исп. 2012, Вып. 3, С. 37-42.
2. Ходов И.А., Кумеев Р.С., Никифоров М.Ю., Голубев В.А., Альпер Г.А. Крестьянинов М.А. Пространственная геометрия парацетамола в ДМФА-D6 по данным 2D NOESY ЯМР спектроскопии // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2013, Т.56, Вып. 3, С. 108-109.
3. Khodov I.A., Nikiforov M.Yu., Alper G.A., Blokhin D.S., Efimov S.V., Klochkov V.V., Georgi N. Spatial structure of felodipine dissolved in DMSO by 1D NOE and 2D NOESY NMR spectroscopy // J. Mol. Str. 2013, V. 1035, P. 358-362.
4. Khodov I.A., Kumeev R.S., Nikiforov M.Yu., Alper G.A. Molecular association in the systems methanol - DMF, methanol - butyl acetate by NMR spectroscopy ^1H // Book of Abstracts. Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter 7th meeting: "NMR in Heterogeneous Systems". Saint Petersburg, Russia. June 28 – July 2, 2010. P. 86.
5. Ходов И.А., Голубев В.А., Кумеев Р.С., Никифоров М.Ю., Альпер Г.А. Температурная зависимость скорости спин – решеточной релаксации и химические сдвиги ядер ^1H молекул DABCO и комплексов DABCO с 5,10,15,20 – тетра(4 – хлорфенил) порфирином цинка в бензоле. // Тез. докл. V Всероссийская конференция «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях» Казань 20-22 апреля 2011 г. С 148
6. Ходов И.А., Кумеев Р.С., Никифоров М.Ю., Альпер Г.А., Мамардашвили Н.Ж. Комплексообразование 5,10,15,20 — тетра(4 - хлорфенил) порфирина цинка с DABCO по данным измерений химических сдвигов ЯМР и времен релаксации ядер ^1H // Тез. докл. XXV Меж-

- дународная Чугаевская конференция по координационной химии. Суздаль, 6-11 июня 2011 г, С. 288.
7. Ходов И.А., Голубев В.А., Кумеев Р.С., Никифоров М.Ю., Альпер Г.А. Пространственное строение N-(4-гидроксифенил) ацетамида (парацетамола) в растворе N,N-диметилформамида - D6 на основе 2D NOESY ЯМР спектроскопии. // Тез. докл. XI Международная конференция «Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах» Иваново, 10-14 октября 2011 г, С.147.
 8. Ходов И.А., Альпер Г. А., Никифоров М.Ю. Конформационный ЯМР-анализ N-(4-Гидроксифенилацетамида в растворе ДМФА на основе 2D NOESY. // Тез. докл. VI конференции молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем», Иваново, 8-12 ноября 2011 г, С.143.
 9. Ходов И.А., Альпер Г. А., Никифоров М.Ю. Конформационный ЯМР-анализ молекул фелодипина в растворе Диметилсульфоксида-D6. // Тез. докл. XVI Симпозиум по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул, Иваново, 18-22 июня 2012 года, С. 73
 10. Khodov I.A., Nikiforov M.Yu., Alper G.A., Blokhin D.S., Efimov S.V., Klochkov V.V., Georgi N. Spatial structure of felodipine in DMSO-d6 solution by 1-D NOE and 2-D NOESY NMR spectroscopy // XV International Youth Scientific School «Actual Problems of Magnetic Resonance and its Applications», Kazan, Russian, 22-26 October, 2012, P. 122.
 11. Kiselev M., Khodov I., Nikiforov M., Alper G., Oparin R., Frolov A., Agapov A., Idrissi A. Towards screening of polymorphism at supercritical parameters of state // 7th International Scientific Conference Kinetics and mechanisms of crystallization. crystallization and next generation material Ivanovo, Russia, 25-28 September, 2012, P. 277.
 12. Ходов И.А., Кумеев Р.С., Никифоров М.Ю., Голубев В.А., Альпер Г.А. Определение межпротонных расстояний конформеров парацетамола в ДМФА-d6 по данным 2D NOESY ЯМР спектроскопии // Сб. статей XIX Всерос. конф. Структура и динамика молекулярных систем: Т2 - М: ИФХЭ РАН, 2012, С. 149-151.
 13. Ходов И.А., Ефимов С.В., Блохин Д.С. Конформации молекул фелодипина в растворе диметилсульфоксида-D6 на основе данных ЯМР // VII Всероссийская школа- конференция молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем» (Крестовские чтения) ,Иваново, 12-16 ноября, 2012, С. 39.
 14. Бичан Н.Г., Ходов И.А. Химическая структура μ -оксодимерной и мономерной формы тетрафенилпорфинового комплекса рения (V) на основе кросс-корреляционного 2D ЯМР анализа // VII Всероссийская школа- конференция молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем» (Крестовские чтения) ,Иваново, 12-16 ноября, 2012, С. 27.
 15. Kiselev M., Khodov I., Nikiforov M., Alper G., Oparin R., Frolov A., Agapov A., Idrissi A. The conformational manifolds of drug-like molecules as studied in combination of experimental and computational techniques // Molecular association in fluid phases and at fluid interfaces. EMLG/JMLG Annual Meeting, Eger, Hungary, 5-9 September, 2012. P. 35
 16. Kiselev M., Khodov I., Nikiforov M., Alper G., Oparin R., Frolov A., Agapov A., Idrissi A. Solvation of conformationally flexible molecules. Experiment and computer simulations // International school-conference «Molecular aspects of solid-state and interfacial electrochemistry» (MolE-2012). Dubna, Russian, 26-31 August, 2012, P. 23.

Подписано в печать 1.07.2013. Формат 60х84 $\frac{1}{16}$. Печать плоская.
Печ. л. 1. Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 1. Тираж 100 экз. Заказ № 186т.

Изд. лицензия ЛР № 010221 от 03.04.1997

Отпечатано в ОАО «Издательство «Иваново».
153012, г. Иваново, ул. Советская, 49. Тел.: 32-47-43, 32-67-91.
E-mail: riaivan37@mail.ru